

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/10, C12Q 1/68, B01L 7/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/47732 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. August 2000 (17.08.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00338 (22) Internationales Anmeldedatum: 3. Februar 2000 (03.02.00) (30) Prioritätsdaten: 199 07 470.4 12. Februar 1999 (12.02.99) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOTIX GMBH [DE/DE]; TGZ Luckenwalde, Im Biotechnologiepark Luckenwalde, D-14943 Luckenwalde (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KRAHN, Thomas [DE/DE]; Eiswaldtstrasse 31, D-12249 Berlin (DE). (74) Anwälte: JUNGBLUT, B. usw.; Gelfertstrasse 56, D-14195 Berlin (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: METHOD FOR FRACTIONATING DOUBLE-STRANDED NUCLEIC ACIDS IN SOLUTIONS IN ORDER TO OBTAIN SINGLE-STRANDED NUCLEIC ACIDS		
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR AUFTRENNUNG VON IN LÖSUNG BEFINDLICHEN DOPPELSTRÄNGIGEN NUKLEINSÄUREN IN EINZELSTRÄNGIGE NUKLEINSÄUREN		
(57) Abstract		
<p>The invention relates to a method for fractionating double-stranded nucleic acids in solutions in order to obtain single-stranded nucleic acids. The invention is characterised in that the nucleic acids are decomposed into single-strands by incident radiation of electromagnetic waves. The frequency and intensity of the electromagnetic waves is chosen in such a way that the hydrogen bonds between the nucleotides of a double-stranded nucleic acid are dissolved by direct interaction of the electromagnetic radiation with the double-stranded nucleic acid.</p>		
(57) Zusammenfassung		
<p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auftrennung von in Lösung befindlichen doppelsträngigen Nukleinsäuren in einzelsträngige Nukleinsäuren. Sie ist dadurch gekennzeichnet, daß die Zerlegung der Nukleinsäuren in Einzelstränge durch Einstrahlung von elektromagnetischen Wellen durchgeführt wird, wobei die Frequenz und die Intensität der elektromagnetischen Wellen mit der Maßgabe ausgewählt sind, daß die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Nukleotiden einer doppelsträngigen Nukleinsäure durch unmittelbare Wechselwirkung der elektromagnetischen Strahlung mit der doppelsträngigen Nukleinsäure gelöst werden.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zur Auftrennung von in Lösung befindlichen doppelsträngigen Nukleinsäuren in einzelsträngige Nukleinsäuren

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auftrennung von in Lösung befindlichen doppelsträngigen Nukleinsäuren in einzelsträngige Nukleinsäuren. - Der Begriff der Nukleinsäuren umfaßt neben DNA und RNA auch PNA. Mit diesem Begriff sind weiterhin natürliche Nukleinsäuren, i.e. Nukleinsäuren voller Länge, umfaßt, als auch Nukleinsäurefragmente. Fragmente bezeichnet dabei Teile einer (natürlich oder gentechnisch hergestellten) Nukleinsäure bzw. synthetisierte Nukleinsäuren. Typische Basenpaarzahlen von Fragmenten liegen beispielsweise im Bereich von kleiner als 10 bis zu über 2000.

20 Verfahren der vorstehenden Art werden z.B. in dem Bereich der Amplifikation bzw. Vervielfältigung von Nukleinsäurestrukturen oder bei der Hybridisierung zu untersuchender Nukleinsäuren mit bekannten Nukleinsäuren zum Zwecke des Erhalts von Informationen über die Sequenz der unbekannten Nukleinsäuren (Stichworte: DNA-Hybridisierungstechniken, DNA Chips) benötigt. Grundlage vieler gentechnischer Analyseverfahren ist die selektiv arbeitende PCR (Polymerase chain reaction), eine einfache Vervielfältigungsmethode für gezielt aussuchbare DNA's oder DNA-Fragmente in einer Reaktionskammer (siehe auch US-A-4,683,202) oder auch in situ, beispielsweise in einem Gewebeschnitt. Nach der Einführung temperaturstabiler Polymerasen hat diese Methode weite Verbreitung in gentechnischen Laboratorien gefunden.

PCR ist insbesondere die gezielte Vervielfältigung eines präzise aus dem Genom ausgesuchten relativ kurzen Segments der zweisträngigen DNA in einfachen Temperaturzyklen. Die Auswahl des DNA-Segments erfolgt durch ein sogenanntes Paar von Primern, zweier DNA-Stücke mit je etwa 20 Basen Länge, die die beiderseitigen Enden des ausgesuchten DNA-Segments codieren. Die Vervielfältigung erfolgt durch ein Enzym namens Polymerase. Die PCR-Reaktion läuft in wässriger Lösung ab, in der wenige Moleküle der Ausgangs-DNA und genügende Mengen an Polymerase, Primern, Triphosphaten der vier Nukleotide, Aktivatoren und Stabilisatoren vorhanden sind. In jedem Temperaturzyklus wird zunächst die Doppelhelix der DNA bei etwa 95 °C "aufgeschmolzen", wobei die beiden Stränge voneinander getrennt werden. Bei etwa 45 °C werden dann die Primer an eine genau passend komplementäre Nukleotidfolge der DNA-Einzelstränge angelagert ("Hybridisierung"). Bei 72 °C wird die Doppelhelix durch den Anbau der komplementären Nukleotide an ein Wachstumsende der Primer durch eine besonders temperaturfeste Polymerase (Taq-Polymerase) wieder zu einer neuen Doppelhelix vervollständigt. Dadurch wird das ausgewählte DNA-Segment zwischen den Primern im Prinzip verdoppelt. In dreißig Zyklen werden also aus einem einzigen Doppelstrang der DNA als Ausgangsmaterial rund eine Milliarde DNA-Segmente erzeugt, deren beide Enden mit den Primern identisch sind.

Die Vervielfältigung der DNA erfolgt bei den heutigen PCR Geräten schon relativ schnell im Vergleich zu den früher benutzten Klonierungsmethoden in lebenden Zellen. Bei optimiertem Steuerprogramm kann innerhalb drei Stunden mit einem handelsüblichen PCR-Gerät aus aufgeschlossenem

Zellmaterial ein etwa 400 Basenpaare langes DNA-Fragment amplifiziert werden, so daß sich die DNA Konzentration deutlich über die Nachweisgrenze (im Agarosegel unter UV Bestrahlung und Färbung mit Ethidiumbromid) erhöht.

5

Das Schmelzen der DNA erfolgte bisher bei einer Temperatur, die knapp über der empirisch ermittelten Schmelztemperatur liegt. Untersuchungen haben gezeigt, daß eine halbe Sekunde Erhitzung auf diese Temperatur für eine
10 vollständige Trennung aller Doppelhelix-Strukturen genügt. Die Hybridisierung braucht ebenfalls nicht lange, wenn die Primer in genügender Konzentration vorhanden sind. Bei optimaler Konzentration sind etwa ein bis zwei Sekunden ausreichend. Die Vervollständigung der DNA hat eine sehr
15 hohe Geschwindigkeit: Pro Sekunde können unter optimalen Temperatur- und Konzentrationsbedingungen 50 bis 100 Basen durch eine spezielle Polymerase angebaut werden (C. R. Newton und A. Graham: PCR; Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin, Oxford, 1994; Seite 31). Da im allge-
20 meinen nur DNA Segmente von bis zu 400 Basen Länge für die Analysen benötigt werden, reichen zehn Sekunden gut für die Verlängerung aus.

Die Zeitdauer für einen Temperaturzyklus hängt somit
25 größtenteils von der Aufheiz- und Abkühlgeschwindigkeit ab, die wiederum vom Flüssigkeitsvolumen, von den Gefäßdimensionen und von der Wärmeleitfähigkeit der Gefäßwände und der Reaktionslösung abhängt. Auf jeder Temperaturstufe sind im Prinzip nur wenige Sekunden vonnöten, teilweise
30 sogar weniger.

Es ist bekannt durch Verringerung des Probenvolumens, Vergrößerung der spezifischen Oberfläche und durch

pneumatisches Anlegen eines Kühlblocks die Übergangszeiten zum folgenden Temperaturniveau so kurz wie möglich zu halten (DE 197 17 085 A 1). Dies ist jedoch nur mit erheblichem mechanischen und mikrosystemtechnischen Aufwand
5 möglich.

Aus der Literaturstelle WO 98/00562 ist es bekannt, den Aufschmelzprozeß mittels eines elektrischen Feldes durchzuführen, welches im Zuge des Reaktionsverlaufes ab-
10 geschaltet oder invertiert wird.

Aus der Literaturstelle WO 96/41864 ist es bekannt, eine zum Aufschmelzen erforderliche Temperatur in der Lösung mittels Einstrahlung von IR- und UV-Licht einzustellen.
15

Aus der Literaturstelle WO 98/06876 ist es bekannt, den Aufheizvorgang zum Aufschmelzen dadurch durchzuführen, daß ein in der Lösung befindliches Festkörpersubstrat mittels Einstrahlung von elektromagnetischen Wellen aufgeheizt
20 wird. Die zum Einsatz kommenden elektromagnetischen Wellen haben Frequenzen unterhalb von 1,07 GHz.

Eine hohe Geschwindigkeit der PCR ist insbesondere aus den folgenden Gründen erwünscht. Im Rahmen des "Human Genome
25 Project" wird versucht, die Sequenz des menschlichen Genoms zu entschlüsseln. Da dieses Genom etwa 3 Milliarden Basenpaare groß ist, und bisher (Stand: Oktober 1998) erst etwa 6,8% davon sequenziert wurde, sprechen jüngste Hochrechnungen davon, daß noch etwa 25 Jahre benötigt wer-
30 den, um das Projekt abzuschließen. Die Förderprogramme für dieses Projekt gehen allerdings davon aus, daß bereits in sechs Jahren alle Basen sequenziert sein sollen. Da die PCR ein wesentlicher Bestandteil der Sequenzierung ist und

alle anderen Schritte der Sequenzierung heute wesentlich schneller ablaufen, hängt der Erfolg des Projekts insbesondere von der Geschwindigkeit der PCR ab. Weiterhin existieren PCR Anwendungen die zur Erkennung von bestimmten Tumorzellen in menschlichem Gewebe eingesetzt werden können. Sollen solche Analysen während einer Operation am offenen Patienten durchgeführt werden, dann wird eine maximale Analysendauer von 10 Minuten gefordert. Die bisher schnellsten beschriebenen PCR Geräte (A. T. Woodley et. Al., "Functional Integration of PCR Amplification and Capillary Electrophoresis in a Microfabricated DNA Analysis Device", Anal. Chem. 68, 4081, Dezember 1996) benötigen jedoch mindestens 15 Minuten bei einem Programm mit 30 Zyklen. Die Zeit, die man zum Aufschließen der Zellen und zur Freilegung der DNA benötigt ist dabei noch nicht eingerechnet. Schließlich wird PCR beispielsweise auch bei der Selektion von gegen vorgegebene Zielstoffe affinen Aptameren bzw. Ribozymen aus hochkomplexen DNA-Bibliotheken (10^{15} und mehr) eingesetzt.

20

Ein weiteres Problem der bekannten PCR Verfahren ist die irreversible Zerstörung der Polymerase durch die hohe Temperatur während des Aufschmelzens. Obwohl es heute schon sehr gut auf Temperaturstabilität optimierte Polymerasen gibt, sinkt die Leistungsfähigkeit der Enzyme bei jedem Zyklus beträchtlich ab. Die Halbwertszeit der Aktivität üblicher Polymerasen (von *Thermus aquaticus*) bei 95 °C beträgt 40 Minuten (C. R. Newton und A. Graham: PCR; Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin, Oxford, 1994; Seite 31). Gerade während der letzten Zyklen wird aber eine sehr hohe Aktivität der Polymerase gefordert, da bereits sehr viele DNA Amplifikate erzeugt wurden, die alle gleichzeitig verlängert werden sollen. Es muß daher

eine entsprechend höhere Menge des teuren Enzyms eingesetzt werden. Einige PCR Verfahren begegnen diesem Problem durch eine sukzessive Verlängerung der Elongationszeiten in jedem Zyklus. Ein Polymerase-Molekül kann dann mehrmals
5 hintereinander an unterschiedlichen Stellen während eines Zyklus eingesetzt werden. Dies erhöht jedoch wiederum die Gesamtdauer der PCR. Es wäre wünschenswert, wenn eine Optimierung der Verlängerungsgeschwindigkeit der Polymerasen gelänge, anstatt die Temperaturstabilität der Enzyme
10 weiter verbessern zu müssen.

Den bekannten Technologien ist gemeinsam, daß der Bedarf an elektrischer Energie aufgrund der notwendigen Heiz- und Kühlprozesse relativ hoch ist mit der Folge, daß ent-
15 sprechende Stromversorgungseinheiten vorgesehen sein müssen. Dies macht Geräte des Standes der Technik voluminös und schwer und erschwert einen vor-Ort Einsatz außerhalb eines speziell vorgesehenen Labors.

20 Daher liegt der Erfindung das technische Problem zugrunde, ein Verfahren anzugeben, mittels welchem innerhalb kürzester Zeit eine doppelsträngige Nukleinsäure in Einzelstränge zerteilt werden kann. Insbesondere ist es wünschenswert, die Zykluszeit für die PCR Amplifikation
25 von Nukleinsäuren zu beschleunigen und auf wenige Sekunden zu reduzieren. Ebenso wünschenswert ist es, die für die Polymerase schädliche Erhitzung auf hohe Temperaturen zu vermeiden und so die PCR effektiver werden zu lassen und gleichzeitig teures Polymerase Enzym einzusparen.
30 Schließlich wäre eine Verringerung des Bedarfes an elektrischer Energie zum Zwecke eines mobilen Einsatzes, beispielsweise mit Batterien, wünschenswert

Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung, daß die Zerlegung der Nukleinsäuren in Einzelstränge durch Einstrahlung von elektromagnetischen Wellen durchgeführt wird, wobei die Frequenz und die Intensität der elektromagnetischen Wellen mit der Maßgabe ausgewählt sind, daß die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Nukleotiden einer doppelsträngigen Nukleinsäure durch unmittelbare Wechselwirkung der elektromagnetischen Strahlung mit der doppelsträngigen Nukleinsäure gelöst werden.

10

Die Erfindung beruht auf den folgenden Erkenntnissen. Die genaue Struktur, die Bindungslängen, die Bindungswinkel und die Bindungsenergie der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleinsäure bzw. DNA Strängen und die molekularen Massenanteile der Nukleotide sind sehr genau bekannt. Wenn dann die Frequenzen der elektromagnetischen Wellen zudem so ausgewählt sind, daß die Wellen mit dem Medium, i.e. Reaktionspuffer bzw. seinen mengenmäßigen Hauptkomponenten, eine möglichst geringe Wechselwirkung aufweisen, kann eine (unerwünschte) thermische Aufheizung des Gesamtgemisches vermieden werden. Es versteht sich, daß die Frequenzen auch so gewählt sein sollten, daß keine störende Absorption durch die Polymerasen stattfindet.

25 Zum Schmelzen der Nukleinsäure muß dem Molekül Energie hinzugefügt werden, deren Betrag mindestens so hoch ist, wie die Bindungsenergie der Wasserstoffbrücke. Dies geschieht in der vorstehend beschriebenen PCR durch Temperaturerhöhung. Die für die Erfindung wesentliche Erkenntnis ist, daß Nukleinsäuremoleküle wegen ungleicher Verteilung elektrischer Ladungen durch elektromagnetische Wechselfelder zum Schwingen angeregt werden können. Die Resonanzfrequenzen können durch absorptionspektroskopische

Messungen gelöster Nukleinsäuren im Millimeterwellen- und Submillimeterwellenbereich (10 - 500 GHz) bzw. im fernen IR (0,5 bis 10 THz) ermittelt werden. Einige dieser Schwingungszustände bewirken eine radiale periodische Valenzschwingung zwischen durch Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verknüpften Nukleotiden verschiedener Stränge. Wenn im Bereich dieser Resonanzfrequenzen mittels eines Hochfrequenzgenerators mit ausreichender Leistung Energie eingestrahlt wird, kann dies zu einer Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen und folglich einer Vereinzelung der beiden Stränge einer doppelsträngigen Nukleinsäure führen. Das millimeterwelleninduzierte Auftrennen in die Einzelstränge kann aufgrund des hyperchromen Effekts der Nukleinsäuren mit Hilfe von Messung der UV-Absorption oder -Transmission (Wellenlänge: 260 nm) nachgewiesen werden. Wird der Hochfrequenzgenerator abgeschaltet (oder wird die Nukleinsäure in einen Bereich geringer elektrischer Feldstärke transportiert), dann rehybridisieren die einzelsträngigen Nukleinsäuren selbstständig zur doppelsträngigen Nukleinsäure. Es ist somit möglich, durch gezielte Einstrahlung elektromagnetischer Wellen mit definierter Frequenz, insbesondere Nukleinsäure-Resonanzfrequenzen, welche abseits von Resonanzen des Mediums bzw. der Polymerasen liegen, selektiv eine Trennung der Nukleinsäurestränge voneinander zu bewirken, und zwar ohne eine beim Stand der Technik festzustellende unerwünschte Erwärmung des Puffers und insbesondere der Polymerasen. Dies wird (neben der nicht beobachteten Erwärmung) auch dadurch belegt, daß die Trennung nur wenige Milliwatt, beispielsweise 0,1 bis 1000 Milliwatt, insbesondere 1 bis 100 Milliwatt, erfordert bei geeigneter Anpassung der Expositionsvorrichtung und Positionierung des Reaktionsgefäßes.

In diesen Zusammenhängen ist aber auch anzumerken, daß die Prozesse der Auftrennung der doppelsträngigen Nukleinsäure nicht auf die direkte Trennung der Wasserstoffbrückenbindungen beschränkt sein müssen. Eine Rolle können auch Schwingungszustände des Gesamtmoleküls oder von Teilen daraus eine Rolle spielen, da diese Schwingungszustände die Wasserstoffbrückenbindungen jedenfalls in angeregte Zustände dann überführen werden, wenn die Schwingungszustände zu beispielsweise sterischen Spannungen im Bereich der Wasserstoffbrückenbindungen führen. Es ist also auch möglich, daß die Anregung von Schwingungszuständen der Stränge zu einer Auftrennung eines Doppelstrangs führen können. Daher meint der Ausdruck der unmittelbaren Wechselwirkung der Strahlung mit der doppelsträngigen Nukleinsäure neben Anregungen der Wasserstoffbrückenbindungen auch die Anregung von anderen Bindungen der Nukleinsäure, welche zumindest zu einer Anregung, i.e. Schwächung der Bindungskräfte, der Wasserstoffbrückenbindung führt. Anregung meint im wesentlichen die Anregung von Dehnschwingungen und/oder Biegeschwingungen molekularer Bindungen. Im Falle von Schwingungen des Molekülgerüsts einer oder beider Stränge können sich dabei auch übergeordnete Strukturen, insbesondere Wellenphänomene und Scherkräfte bilden.

Da in einer Nukleinsäure immer mindestens ein gebundenes Stickstoffatom beteiligt ist, haben jedenfalls die Wasserstoffbrücken immer eine niedrigere Bindungskraft als die des umgebenden Wassers, welches nur stärker gebundene Sauerstoffatome als Donoren besitzt. Es ist somit bei geeigneter Wahl der Einstrahlfrequenz möglich, gezielt die Nukleinsäure zu schmelzen, ohne gleichzeitig das

Umgebungswasser in störender Weise zu erhitzen. Aber auch Frequenzen oberhalb der Resonanzfrequenz des Wasser sind einsetzbar, da beispielsweise im Bereich von 0,5 bis 2,0 THz charakterische Resonanzen des Molekülgerüsts ("At-
5 mung") beobachtet werden. Auch bei Wahl solch hoher (auf eine geeignete Resonanzfrequenz des Molekülgerüsts abgestimmter) Frequenzen erfolgt letztendlich eine Aufspaltung der Wasserstoffbrückenbindungen aufgrund der dabei entstehenden "Spannungen" im Bereich der Wasserstoffbrücken. Es
10 ist auch möglich, sowohl im Bereich der Wasserstoffbrücken-Resonanzen als auch im Bereich der Gerüst-Resonanzen einzustrahlen.

Im Rahmen der Erfindung bevorzugt ist es, wenn die Frequenz
15 der elektromagnetischen Strahlung im Bereich von 10 GHz bis 2THz, vorzugsweise 10 bis 250 GHz, höchstvorzugsweise 30 bis 79 GHz, beispielsweise 45 bis 53 GHz, eingestellt ist mit der Maßgabe, daß die eingestellte Frequenz zumindest teilweise solche Schwingungszustände der Nukleinsäure
20 anregt, welche in einer Trennung ausschließlich der Wasserstoffbrückenbindungen resultieren, nicht jedoch Bindungen einer Polymerase spaltet (dies schließt geringfügige Zersetzungsraten von bis zu 10%, vorzugsweise weniger als 2%, der Rate bei Erwärmung auf 95°C ein) oder zu
25 einer Temperaturerhöhung eines Mediums führt (dies schließt unwesentliche Temperaturerhöhungen eines nicht thermostatisierten Mediums von bis zu 20°C / min., vorzugsweise von weniger als 5°C / min. ein). Dies ist der Frequenzbereich, in welchem experimentell geeignete
30 Resonanzen gefunden wurde, um doppelsträngige DNA bei Temperaturen unterhalb der DNA-Schmelztemperatur, bis hinunter zu 20°C, zu schmelzen.

Von selbstständiger Bedeutung im Rahmen der Erfindung ist die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens in einem Verfahren zur in vitro Amplifikation von Nukleinsäuren mit den folgenden Verfahrenstufen: a) Zerlegung der Nukleinsäuren in Einzelstränge, b) Anhybridisierung von Primern an die Einzelstränge aus Stufe a), c) Verlängerung der in Stufe b) anhybridisierten Primer durch (Desoxy-) Ribonukleosidtriphosphate mittels Einsatz einer Polymerase, d) Rückführung der in Stufe c) erhaltenen Nukleinsäuren in die Stufe a), wobei die Stufen a) - d) so oft wiederholt werden, bis ein vorgegebener Amplifikationsfaktor erreicht ist und wobei die elektromagnetische Strahlung in Stufe a) eingestrahlt wird. Bevorzugt ist es, wenn auf Nukleinsäure-Synthese-Geschwindigkeit optimierte Polymerasen in Stufe b) eingesetzt werden. Diese brauchen nämlich nicht mehr die beim Stand der Technik erforderliche Temperaturbeständigkeit aufzuweisen.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin eine Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4 mit einer Reaktionskammer zur Aufnahme einer Lösung mit Nukleinsäuren, mit einer Vorrichtung zur Erzeugung elektromagnetischer Wellen sowie einem Antennenelement zur Abstrahlung der elektromagnetischen Strahlung, wobei das Antennenelement unmittelbar bei der Reaktionskammer angeordnet ist und wobei zumindest eine Betriebsfrequenz der Vorrichtung zur Erzeugung elektromagnetischer Strahlung im Bereich von 10 bis 250 GHz, vorzugsweise 30 bis 79 GHz, und/oder 0,5 bis 2,0 THz liegt. - Der Ausdruck der Antennenelemente bezeichnet jegliche Bauelemente, von denen elektromagnetische Wechselfelder emittiert werden können. Diese können beispielsweise um die Reaktionskammer herum oder auch nur an einer Seite

außenseitig angeordnet sein. Denkbar ist auch der Einbau eines Antennenelements im Reaktionskammerinneren. Eine besonders vorteilhafte Ausführungsform für den unteren genannten Frequenzbereich ist dadurch gekennzeichnet, daß
5 die Reaktionskammer innerhalb eines als Antennenelement funktionierenden elektrischen Resonanzkörpers, insbesondere eines Topfkreises oder Hohlleiters, angeordnet ist.

Die Reaktionskammer kann auf verschiedene Weisen ausgebildet sein. So kann die Reaktionskammer als Rührkessel-Reaktor ausgebildet sein. Dies meint, daß die Reaktionslösung stationär bleibt und ggf. agitiert wird. Es ist aber auch möglich, die Reaktionskammer als Rohrreaktor auszubilden, wobei im Inneren des Rohrreaktors und in
15 Richtung der Längserstreckung des Rohrreaktors stehende elektromagnetische Wellen erzeugbar sind. In einem Rohrreaktor ist die Reaktionslösung mobil und strömt in Richtung der Längserstreckung des Reaktors. Dabei ist der Reaktionsfortschritt bzw. sind die Reaktionsstufen eine
20 Funktion des Ortes (in erster Näherung eindimensional entlang der Längserstreckung). Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Reaktionskammer ist eine (ggf. beidseitig geschlossene) Kapillare, wobei die Kapillare hinsichtlich ihrer Längserstreckung zumindest zum Teil in
25 Richtung des elektrischen Feldvektors der elektromagnetischen Strahlung ausgerichtet ist.

Mit der Erfindung wird erreicht, daß bei der PCR die Aufheiz- und Abkühlungsperiode entfällt, so daß sich die Zykluszeit und damit die Gesamtdauer des Amplifikationsvorgangs im Vergleich zur vorbekannten PCR erheblich verkürzt. Gleichzeitig wird die zur Vervielfachung notwendige Polymerase praktisch nicht durch

Hitzenaturierung geschädigt, so daß eine kleinere Menge des teuren Enzyms eingesetzt werden kann. Dies beruht letztendlich darauf, daß Resonanzen der Polymerase typischerweise nicht bei gleichen Frequenzen wie die Resonanzen zwischen zwei Nukleinsäure Strängen oder Molekül-Resonanzen in einem Strang liegen. Wesentlich ist hierbei also letztendlich, daß der Aufschmelzvorgang erfindungsgemäß nicht durch Temperaturerhöhung, sondern durch Einstrahlung elektromagnetischer Wellen mit einer definierten Nukleinsäure- bzw. Wasserstoffbrückenbindungsspezifischen Frequenz erfolgt.

Folgend werden Details der Erfindung sowie weitere mögliche Ausführungsformen der Erfindung näher erläutert.

15

Bei der PCR durchläuft das Reaktionsgemisch im einzelnen die folgenden physikalischen und chemischen Zustandsänderungen:

20 a) Das Reaktionsgemisch wird mit elektromagnetischen Wellen einer oder mehrerer definierter Frequenzen mit ausreichender Leistung bestrahlt. Doppelsträngige DNA geht dabei in einzelsträngige DNA über. Die Temperatur des Reaktionsgemisches wird dabei von den elektromagnetischen Schwingungen nicht wesentlich beeinflusst.

b) Die Einstrahlung der elektromagnetischen Wellen wird beendet und das Reaktionsgemisch wird auf eine geeignete Temperatur geregelt, die unterhalb der Anlagerungstemperatur der Primer liegt. Die Primer können sich an den komplementären Stellen der einzelsträngigen DNA anlagern.

30 c) Das Reaktionsgemisch wird auf eine Temperatur geregelt, bei der die Polymerase mit optimaler Geschwindigkeit den komplementären Strang mit Nukleotiden auffüllt. Diese drei

Stufen können so oft wie gewünscht wiederholt werden. Das entstandene doppelsträngige Reaktionsprodukt wird dabei wieder in (a) eingesetzt.

5 In der Praxis ist es möglich, für die Verfahrensstufen b) und c) die gleiche Temperatur, beispielsweise im Bereich von 20°C bis 80 °C, einzustellen. Der Verlauf der Gesamtreaktion ist dann isotherm. Dies ermöglicht eine beachtliche apparative Vereinfachung gegenüber PCR gemäß dem
10 Stand der Technik, bei welchem mit hoher Präzision und folglich hohem technischen Aufwand unterschiedliche Temperaturstufen angefahren und eingeregelt werden müssen, und dies zudem möglichst schnell. Mit anderen Worten ausgedrückt, bei isothermer Verfahrensweise gemäß der Er-
15 findung entfallen zudem die zeitaufwendigen Heiz- und Kühlphasen zwischen den verschiedenen Verfahrensstufen.

Das Reaktionsgemisch setzt sich dabei aus den üblichen Komponenten zusammen, wie sie bei der konventionellen PCR
20 oder deren Weiterentwicklungen benutzt werden. Dies sind mindestens ein geeignetes Lösungsmittel, eine sehr kleine Menge Nukleinsäure als Matritze, ein oder mehrere geeignete Oligonukleotide als Primer, Desoxynukleotidtriphosphate aller in der Matritze zwischen den Primern
25 liegenden Nukleinbasen, Eine Substanz, welche die Kettenverlängerung katalysiert (im übrigen Text Polymerase genannt).

Im Prinzip können alle Varianten, Abarten und Weiter-
30 entwicklungen der PCR (insbesondere die Sequenzierreaktion mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger) mit diesem Verfahren durchgeführt werden. Gegebenenfalls müssen oder

können entsprechende Anpassungen durchgeführt werden, um die Vorteile der Erfindung optimal ausnützen zu können.

Der wichtigste Nutzen der Erfindung ist darin begründet, 5 daß in der Praxis die Temperatur des Reaktionsgemisches nie die Schmelztemperatur der beteiligten Nukleinsäurepaarungen erreicht oder gar überschreitet. In der Regel kann eine PCR bei Temperaturen des Reaktionsgemisches von nicht mehr als 75°C, insbesondere nicht mehr als 60°C, 10 durchgeführt werden. Es werden folglich keine speziellen hitzeresistenten Polymerasen mehr benötigt. Es liegt nahe, die eingesetzten Polymerasen so auszuwählen bzw. zu konstruieren, daß sie möglichst schnell die Elongation des neu aufzubauenden DNA Stranges synthetisieren. So wird der 15 bisher langsamste und damit geschwindigkeitsbestimmende Schritt der PCR deutlich verkürzt. Natürlich spart man auch die Aufheiz- und die Abkühlzeiten für die Auftrennung der beiden DNA Stränge ein, da die elektromagnetischen Wellen unmittelbar auf die DNA einwirken. Bei der konven- 20 tionellen PCR muß sich zuerst der Heizblock und dann das Reaktionsgefäß und das umgebende Lösungsmittel aufheizen, bevor die Wärme an die DNA Moleküle weitergeleitet wird.

Die elektromagnetischen Wellen werden in der Praxis von 25 einem elektronischen Hochfrequenzgenerator erzeugt und mit einer Abstrahlvorrichtung (Antenne) auf das dicht positionierte Reaktionsgemisch gerichtet. Als Hochfrequenz-Generatoren kommen z.B. Gunn-, Impatt-, Backward-Wave- oder Klystron-Oszillatoren in Frage. Eine zu tief liegende 30 (Grund-) Frequenz eines HF-Generators kann durch Frequenzvervielfachung z.B. an einer Varactor-Diode auf das erforderliche Niveau angehoben werden. Man kann jedoch auch das Reaktionsgemisch innerhalb eines elektrischen

Resonanzkörpers (z. B. Topfkreis oder Hohlleiter) anbringen, der durch den Generator zu stehenden Schwingungen angeregt wird. Weiterhin ist es möglich, ein langgestrecktes, dünnes Reaktionsgefäß (z. B. Kapillare) zu verwenden, 5 das von dem Reaktionsgemisch mit langsamer Fließgeschwindigkeit durchströmt wird. Entlang der Achse dieses Reaktionsgefäßes wird eine stehende Welle erzeugt, die in regelmäßigen Abständen Knotenpunkte bildet, an denen die Intensität der elektrischen Wellen sich konzentriert, 10 während dazu um 90° phasenverschoben Bereiche existieren, in denen sich die Wellen komplett auslöschen. Das Reaktionsgemisch wird während des Passierens dieser Stellen regelmäßig aufgeschmolzen. Durch geschickte Wahl der Parameter (lineare Strömungsgeschwindigkeit im Verhältnis 15 zur Wellenlänge) kann dies mit den Zyklen der PCR synchronisiert werden. Es kommt somit zu einer kontinuierlichen Amplifikation entlang des Reaktionsgefäßes. Sowohl die Millimeterwellenkomponenten als auch die Kapillarstrukturen als ausgebildete Reaktionskammern können unschwer 20 mikrosystemtechnisch hergestellt werden, was eine Integration der Bauteile auf einem Modul besonders begünstigt.

Die Frequenz der elektromagnetischen Wellen ergibt sich gemäß der vorstehenden Ausführungen aus den radialen Reso- 25 nanzschwingungen zwischen den Nukleotidsträngen. Im Normalfall liegt die Frequenz zwischen 30 und ca. 60 GHz. Gegebenenfalls kann es sinnvoll sein, bei mehreren Frequenzen in diesem Bereich gleichzeitig einzustrahlen. Die (zusätzliche) Einstrahlung von völlig anderen Frequenzen 30 kann unter Umständen nützlich sein, um Quervernetzungen bei komplizierten Tertiärstrukturen der DNA aufzulösen und dadurch die Amplifikation des DNA-Abschnittes zu erleichtern. Die Polymerase benötigt zum optimalen Arbeiten in

der Regel eine Temperatur die über der Zimmertemperatur liegt (bei den heute gebräuchlichen Taq-Polymerasen ca. 72 °C). Durch dosiertes (zusätzliches) Einstrahlen bei einer Resonanzfrequenz des Lösungsmittels (in der Regel salzhaltiger wäßriger Puffer) kann die Temperatur des Reaktionsgemisches erhöht werden. Es entfällt somit auch eine zusätzliche Heizquelle.

Die Erfindung kann auch im Rahmen der in-situ PCR vorteilhaft verwendet werden. Hierbei wird beispielsweise ein Gewebeschnitt mit den PCR Reagentien versetzt, wobei zumindest ein Primer eine Markierung trägt. Mit Markierung sind jegliche Art von meß- oder färbetechnisch wirksame Markierungsatome oder Markierungsmoleküle gemeint. Dann wird der Gewebeschnitt dem o.g. Reaktionszyklus ausgesetzt mit dem Ergebnis, daß Nukleinsäuren mit sehr hoher Empfindlichkeit und lateraler Auflösung detektierbar sind. Mit der Erfindung wird erreicht, daß eine Austrocknung eines Gewebeschnitts und/oder eine Denaturierung von Stoffen darin aufgrund der geringeren Aufheizung zuverlässig verhindert werden kann, und zwar unter Vermeidung der ansonsten hierfür erforderlichen Maßnahmen.

Folgend wird die Erfindung anhand von lediglich Ausführungsbeispielen darstellenden Figuren näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1a: eine Darstellung eines apparativen Aufbaus zur Bestimmung von für die Trennung der Nukleinsäure Stränge einer doppelsträngigen Nukleinsäure Frequenzen,

Fig. 1b: eine Darstellung eines apparativen Aufbaus zur Verfolgung der Trennung der Nukleinsäure Stränge mittels UV-Transmission,

5 Fig. 1c: eine schematische Darstellung der geometrischen Zusammenhänge für eine erfindungsgemäße Vorrichtung,

Fig. 1d: einen apparativen Aufbau zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens,

10

Fig. 1e: eine zum Gegenstand der Fig. 1d alternative Ausführungsform,

Fig. 1f: eine zu den Gegenständen der Figuren 1d und 1e
15 weiterhin alternative Ausführungsform

Fig. 2: Dämpfungsmessungen von Puffer und NaCl-Lösung über Wasser,

20 Fig. 3: Dämpfungsmessungen verschiedener hochmolekularer DNA über Puffer,

Fig. 4: Dämpfungsmessungen verschiedener kurzer DNA über Puffer,

25

Fig. 5: Konzentrationsabhängigkeit der Dämpfung über Puffer für doppelsträngige DNA,

Fig. 6: Zeitabhängigkeit der UV-Absorption bei für doppel-
30 strängiger DNA spezifischer UV-Frequenz bei Millimeterwelleneinstrahlung zur Beobachtung des hypochromatischen Effekts,

Fig. 7: eine Darstellung entsprechend Fig. 6 mit Rekombination nach Millimeterwellenabschaltung und

Fig. 8: eine Darstellung entsprechend Fig. 7, jedoch mit
5 zusätzlicher Zugabe doppelsträngiger DNA während der Millimeterwelleneinstrahlung zum Zeitpunkt $t = 300s$.

In der Fig. 1a erkennt man ein Gehäuse 1, in welchem ein Hohlleiter 2 (80mm langes Stück WR28 Hohlleiter mit Standardflanschen für Ka Band, WR19 Hohlleiter für U Band) eingerichtet ist. Der Hohlleiter 2 wird mittels eines HF-Generators auf einer einstellbaren Frequenz angeregt. Hierzu ist im Rahmen des Hohlleiters 2 eine Abstrahlantenne eingerichtet. Weiterhin ist eine Empfangsantenne
15 vorgesehen, welche ebenso wie die Abstrahlantenne mit einem Spektrumanalyzer 9 verbunden ist. Durch das Innere des Hohlleiters 2 ist eine Kapillare 4 Glas, Länge 80mm, Innendurchmesser 0,7mm, Außendurchmesser 1,6mm) geführt, durch welche mittels einer Saugvorrichtung 8 Flüssigkeit
20 aus einem Vorratsgefäß 10 angesaugt und beispielsweise auf einen Flüssigkeitsspiegel von 10mm oberhalb der Oberkante des Hohlleiters 2 eingestellt werden kann (vertikale Anordnung der Kapillare). Mit diesem Aufbau wurden die folgend beschriebenen Dämpfungsmessungen durchgeführt, und
25 zwar bei Frequenzen im Bereich von 40 bis 60 GHz.

In der Figur 1b ist ein Aufbau zur Beobachtung des hypochromatischen Effekts dargestellt. Man erkennt als wesentliche Elemente einen Hohlleiter 2, einen auf eine
30 geeignete Frequenz eingestellten HF-Generator 3 mit Abstrahlantenne und eine Kapillare 4 (mit zu untersuchender Flüssigkeit). Im Rahmen des Hohlleiters 2 ist ein Anpassungselement 7 zur Anpassung an die eingestrahlte

Hochfrequenz vorgesehen. Weiterhin sind eine UV-Lichtquelle 5 (200 - 1000nm) sowie ein UV-Detektor 6 (spektrale Selektivität im Wellenlängenbereich von 250 - 260 nm) eingerichtet, wobei die Anordnung so getroffen ist, daß die Kapillare in Ihrer Längsrichtung durchstrahlt wird. Die UV-Transmissionsmessungen erfolgten bei 260 nm und einer HF-Frequenz von 49 GHz. Mit einer Anordnung nach Fig. 1b lassen sich bei 20mW Sendeleistung 50% aller eingesetzten doppelsträngigen Nukleinsäuremoleküle innerhalb von 30s in einzelsträngige Nukleinsäuremoleküle aufspalten.

Die Fig. 1c zeigt eine zweckmäßige Ausrichtung von Kapillare 4 und Hohlleiter 2 bzw. elektrischem Feldvektor zueinander für einen geschlossenen Reaktor. Man erkennt, daß die Längserstreckung der Kapillaren parallel zum Vektor des elektrischen Feldes der (stehenden) elektromagnetischen Welle verlaufen sollte.

In der Figur 1d ist eine einfache Ausführungsform einer für PCR geeigneten Apparatur gezeigt. Man erkennt als wesentliche Elemente den Hohlleiter 2, das Anpassungselement 7 und die Kapillare 4. Die Kapillare 4 ist beidseitig verschlossen. Die Erzeugung der Hochfrequenz erfolgt hier durch eine Gunn-Diode 11.

In der Figur 1e ist ein Aufbau dargestellt, mit welchem Reaktionen in einer Mehrzahl von Kapillaren 4 durchgeführt werden können. Hierbei ist zu beachten, daß jede Kapillare in einem Maximum des elektrischen Feldvektors der stehenden Welle angeordnet ist, wie durch die schematisch angedeutete Welle verdeutlicht.

Die Figur 1f zeigt eine Ausführungsform von selbstständig erfinderischer Bedeutung. Hierbei ist ein Reaktionsabschnitt der Kapillare 4 in Längsrichtung des Hohlleiters 2 und orthogonal zum elektrischen Feldvektor und in Richtung 5 der stehenden Welle verlaufend angeordnet. Das Reaktionsgemisch durchströmt dabei die Kapillare 4 mit einer definierten Strömungsgeschwindigkeit. Im Zuge der Durchströmung findet dann an Stellen hoher elektrischer Feldstärke die Trennung der doppelsträngigen Nukleinsäure 10 in Einzelstränge statt, während in Bereichen kleiner elektrischer Feldstärke die Hybridisierung und Polymerasekatalysierte Anlagerung von Nukleotiden erfolgt. Im Zuge des Durchströmens wird also eine Mehrzahl von Amplifikationszyklen durchlaufen, wobei die Anzahl der Zyklen durch 15 $n = 2l / \lambda$ (n = Anzahl, l = Länge der Kapillare in Wellenrichtung, λ =Wellenlänge) gegeben ist. Die Strömungsgeschwindigkeit läßt sich dabei ohne weiteres in Verbindung mit der (konstant gehaltenen) Temperatur im Hinblick auf maximale Gesamtamplifikation optimieren.

20

Bei den mit der Apparatur nach Fig. 1a durchgeführten Dämpfungsmessungen wurde zunächst die Dämpfung, i.e. Absorption in Abhängigkeit von der Frequenz des Mediums gegenüber Wasser bestimmt. Diese Dämpfungskurven wurden 25 dann als Bezugsgröße für die Bestimmung der Dämpfung bei Einbringungen einer DNA in das Medium genommen. Auf diese Weise erhält man ein Millimeterwellen-Absorptionsspektrum, welches von Mediumartefakten befreit ist.

30 Bei den UV-Absortionsmessungen ist die gewählte UV-Wellenlänge spezifisch für einzelsträngige DNA (hyperchromatischer Effekt). Eine hohe Transmission steht also für eine geringe Konzentration an einzelsträngiger DNA. Eine

niedrige Transmission zeigt dagegen das Vorliegen einzelsträngiger DNA an.

In der Figur 2 erkennt man den Dämpfungsverlauf eines
5 Puffers der Zusammensetzung 9g/l NaCl, 50mM Tris/HCl, pH
8, in 1l ddH₂O sowie von 1M NaCl/dH₂O (d steht für destilliert). Während bei der NaCl-Lösung ein starkes Minimum bei ca. 45 GHz beobachtet wird, ist der spektrale Verlauf für den Puffer nahezu waagrecht. Der Puffer oder die NaCl
10 wurde in allen folgenden Experimenten unverändert verwendet.

In der Figur 3 sind die Dämpfungen verschiedener hochmolekularer DNA dargestellt (für eine Aufstellung aller hier und folgend verwendeter DNA Proben siehe Tab.1).
15 Man erkennt, daß jedenfalls bei vergleichsweise kurzer DNA ein charakteristisches Minimum im Bereich von 47 bis 51 GHz auftritt; höchstwahrscheinlich eine Frequenz, bei welcher die DNA Moleküle jedenfalls teilweise unmittelbar
20 angeregt werden. Die Figur 4 bestätigt dies insbesondere auch in der Gegenüberstellung der Spektren doppelsträngiger DNA mit der gleichen, jedoch einzelsträngigen DNA. Die Figur 5 belegt die Konzentrationsabhängigkeit für die doppelsträngige DNA 1.

25

In den Versuchen der Figuren 6 bis 8 wurde bei $t=0$ eine Lösung der doppelsträngigen DNA 1 des Herstellers Sigma mit der Konzentration 10mM eingesetzt. In unteren Bereich der Diagramme ist der Verlauf der Betriebsspannung des HF-
30 Generators 3 dargestellt. Eine Betriebsspannung von 0 steht für ausgeschalteten HF-Generator 3. Eine Betriebsspannung von 5V steht für eingeschalteten HF-Generator 3.

In der Figur 6 erkennt bei kleinen Zeiten und ausgeschaltetem HF-Generator eine hohe und konstante Transmission aufgrund des Vorliegens doppelsträngige DNA. Zeitgleich mit der Anschaltung des HF-Generators 3 beginnt die Transmission jedoch abzunehmen, was auf der Abnahme der Konzentration doppelsträngiger DNA beruht. Die "Spitzen" beruhen auf Emissionsartefakten der UV-Quelle.

In dem Versuch der Figur 7 wurde verifiziert, daß die Abnahme der Konzentration doppelsträngiger DNA tatsächlich mit der Bildung von einzelsträngiger DNA korreliert ist. Denn nach dem Abschalten des HF-Generators erkennt man, daß die Transmission wieder ansteigt; das Ergebnis der Rekombination der einzelnen Stränge zur doppelsträngigen DNA.

In dem Versuch der Figur 8 wurde während der Anschaltdauer des HF-Generators 3 doppelsträngige DNA nachgegeben mit dem Ergebnis, daß intermediär die Transmission wieder ansteigt.

Eine Vorrichtung durch Durchführung des erfindungsgemäßen in vitro PCR-Verfahrens ist im Prinzip wie im Stand der Technik aufgebaut. Der wesentliche Unterschied besteht darin, daß zusätzlich oder anstelle der konventionellen Einrichtungen zur Erwärmung auf 95 °C eine Einrichtung zur Einstrahlung elektromagnetischer Wellen in die Reaktionskammer eingerichtet ist. Bezüglich Details hierzu darf auf die Figuren 1a bis 1f verwiesen werden, die weiteren Komponenten entsprechen dem üblichen Aufbau und brauchen daher nicht näher erläutert werden. Es versteht sich, daß die UV-Quelle und der UV-Detektor für die Durchführung der PCR entbehrlich sind.

5

10

15

20

25

30

Probe	Beschreibung	Konz.	Literatur	Hersteller
DNA1	10 b langes Oligonukleotid mit der Sequenz 5'-GCGAATTTCGC-3'; Liegt in 1 M NaCl Lösung bei Zimmertemperatur nachweislich in doppelsträngiger Form vor, da es eine palindromische Sequenz hat. Schmelztemperatur ca. 50° C; Synthesemaßstab: 2 µmol.	0,4 g / l	[Bresslauer 1986]	TIB Molbiol
dsDNA1	Identisch mit DNA1, jedoch anderer Hersteller und 10 µmol Synthesemaßstab	2,0 g / l	[Bresslauer 1986]	Interactiva
ssDNA2	10 b langes Oligonukleotid mit der Sequenz 5'-GGGAAAAGGG-3'; Liegt in 1 M NaCl Lösung in einzelsträngiger Form vor, da es keine Basenpaarungen mit sich selbst eingehen kann. Errechnete Schmelztemperatur (bei einer Paarung mit einem komplementären Oligonukleotid) ist aber genauso hoch wie bei DNA1 und dsDNA1 (ca. 50° C); Synthesemaßstab: 10 µmol.	1,9 g / l	Eigene Konstruktion	Interactiva
pUC8	2,6 kb langes, zirkuläres Plasmid. Liegt in der sog. supercoiled Form vor. Wird normalerweise zur Klonierung von <i>E. coli</i> Stämmen eingesetzt.	0,1 g / l	[Edwards 1984]	Sigma
L_gt11	Modifizierte DNA des Lamba Prophagen, Stamm gt11. Ca. 50 kb lang und linear; Normalerweise zum Klonieren langer DNA Fragmente (bis 10 kb) in spezielle <i>E. coli</i> Stämme.	0,05 g / l	[Sanger 1982]	Promega
Lambda	Aufgereinigte DNA des Lambda Prophagen. In höherer Konzentration als L_gt11 und nicht modifiziert. Ca. 50 kb lang.	10 g / l	[Sambrook 1989]	Sigma
HSP	Vertebraten DNA aus Heringssperma aufgereinigt; Heterogen geschnittene DNA. Preiswert und in hoher Konzentration verfügbar.	10 g / l	[Sambrook 1989]	Fluka

Patentansprüche

1. Verfahren zur Auftrennung von in Lösung befindlichen
doppelsträngigen Nukleinsäuren in einzelsträngige
5 Nukleinsäuren,

dadurch gekennzeichnet,

10 daß die Zerlegung der Nukleinsäuren in Einzelstränge
durch Einstrahlung von elektromagnetischen Wellen durch-
geführt wird,

wobei die Frequenz und die Intensität der elektromag-
netischen Wellen mit der Maßgabe ausgewählt sind, daß
15 die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Nukleotiden
einer doppelsträngigen Nukleinsäure durch unmittelbare
Wechselwirkung der elektromagnetischen Strahlung mit der
doppelsträngigen Nukleinsäure gelöst werden.

20

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
die Frequenz der elektromagnetischen Strahlung im Bereich
von 10GHz bis 2THz, vorzugsweise 30 bis 79 GHz,
eingestellt ist mit der Maßgabe, daß die eingestellte
25 Frequenz zumindest teilweise solche Schwingungszustände
der Nukleinsäure anregt, welche in einer Trennung
ausschließ- lich der Wasserstoffbrückenbindungen re-
sultieren, nicht jedoch Bindungen einer Polymerase spal-
tet oder zu einer Temperaturerhöhung eines Mediums
30 führt.

3. Verwendung eines Verfahrens nach Anspruch 1 oder 2 in einem Verfahren zur in vitro Amplifikation von Nukleinsäuren mit den folgenden Verfahrenstufen: a) Zerlegung der Nukleinsäuren in Einzelstränge, b) Anhybridisierung von Primern an die Einzelstränge aus Stufe a), c) Verlängerung der in Stufe b) anhybridisierten Primer durch (Desoxy-)Ribonukleosidtriphosphate mittels Einsatz einer Polymerase d) Rückführung der in Stufe c) erhaltenen Nukleinsäuren in die Stufe a), wobei die Stufen a) - d) so oft wiederholt werden, bis ein vorgegebener Amplifikationsfaktor erreicht ist und wobei die elektromagnetische Strahlung in Stufe a) eingestrahlt wird.
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß auf Nukleinsäure-Synthese-Geschwindigkeit optimierte Polymerasen in Stufe b) eingesetzt werden.
5. Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4 mit einer Reaktionskammer zur Aufnahme einer Lösung mit Nukleinsäuren, mit einer Vorrichtung zur Erzeugung elektromagnetischer Wellen sowie mit einem Antennenelement zur Abstrahlung der elektromagnetischen Strahlung, wobei das Antennenelement unmittelbar bei der Reaktionskammer angeordnet ist und wobei zumindest eine Betriebsfrequenz der Vorrichtung zur Erzeugung elektromagnetischer Strahlung im Bereich von 10 bis 250 GHz und/oder von 0,5 bis 2,0 THz liegt.
6. Vorrichtung nach Anspruch 5, wobei die Reaktionskammer innerhalb eines als Antennenelement funktionierenden

elektrischen Resonanzkörpers, insbesondere eines Topfkreises oder Hohlleiters, angeordnet ist.

5 7. Vorrichtung nach Anspruch 5 oder 6, wobei die Reaktionskammer als Rührkessel-Reaktor ausgebildet ist.

8. Vorrichtung nach Anspruch 5 oder 6, wobei die Reaktionskammer als Rohrreaktor ausgebildet ist und wobei im
10 Inneren des Rohrreaktors und in Richtung der Längserstreckung des Rohrreaktors stehende elektromagnetische Wellen erzeugbar sind.

15

20

25

30

Fig. 1a

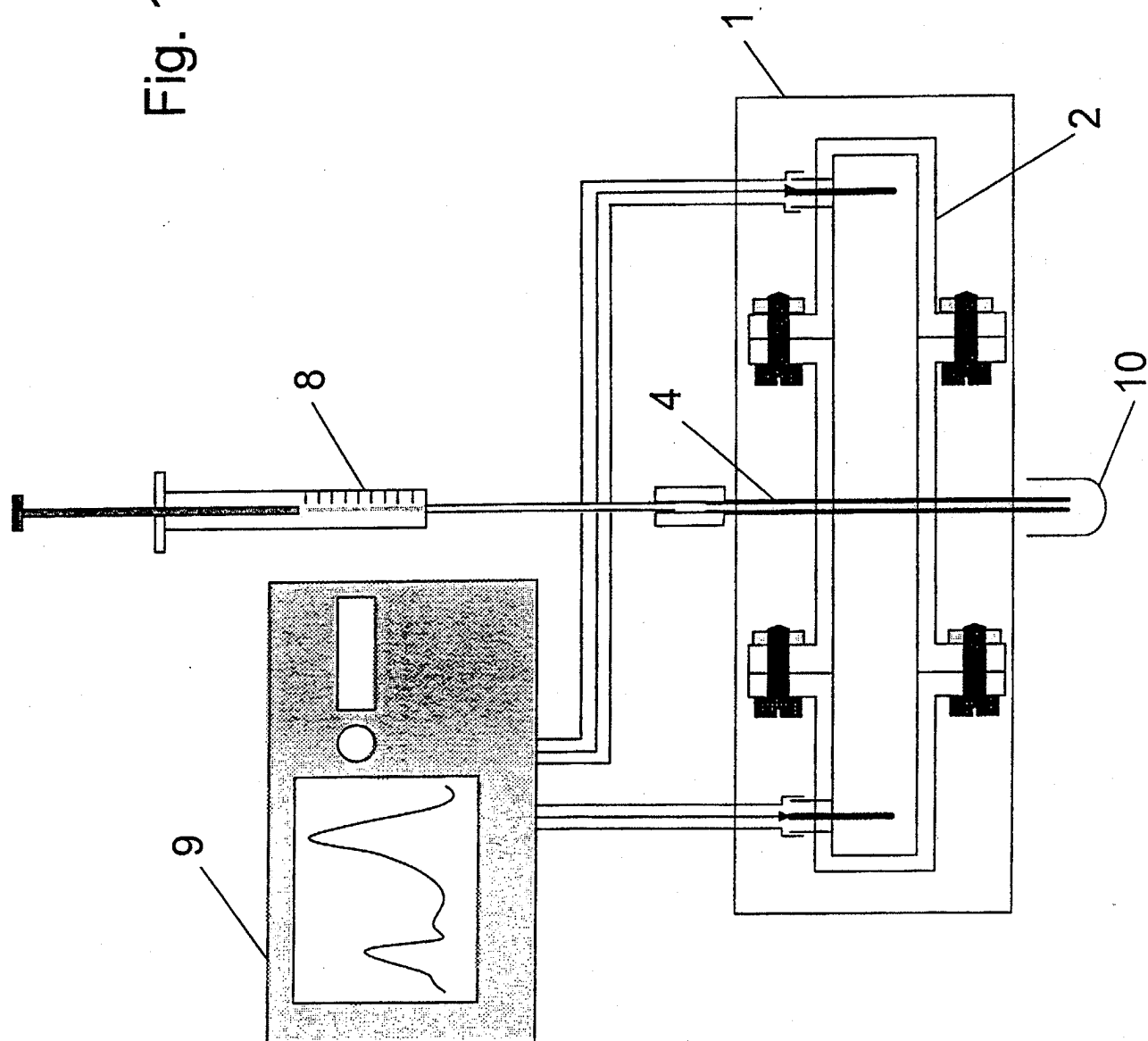
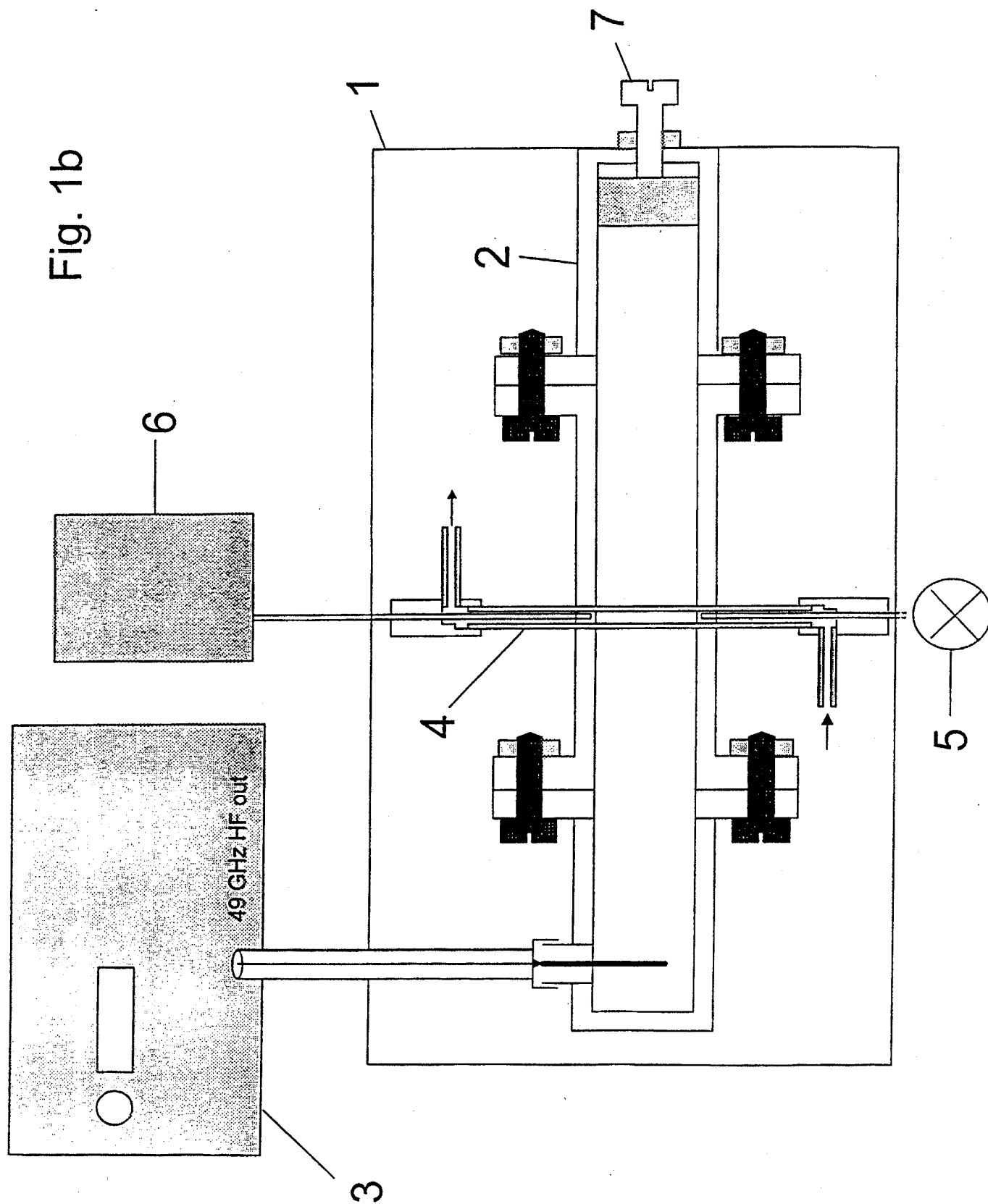


Fig. 1b



Position und Ausrichtung der Kapillare

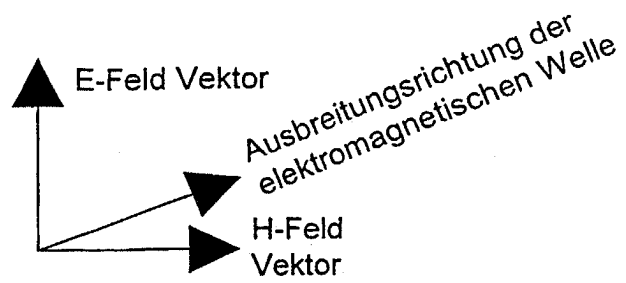


Fig. 1c

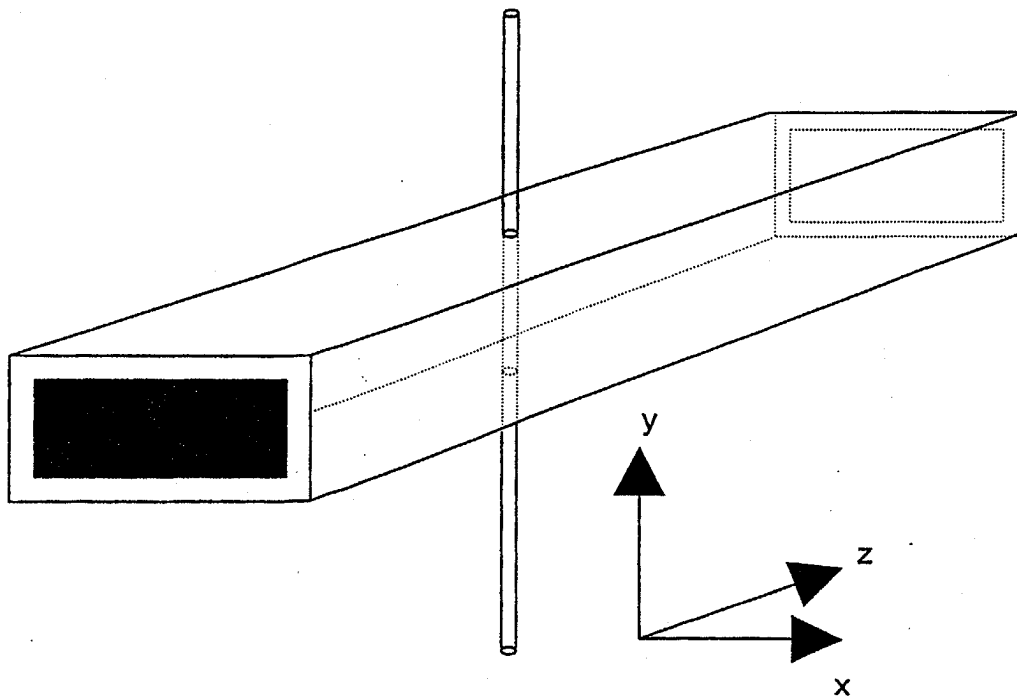


Fig. 1 d

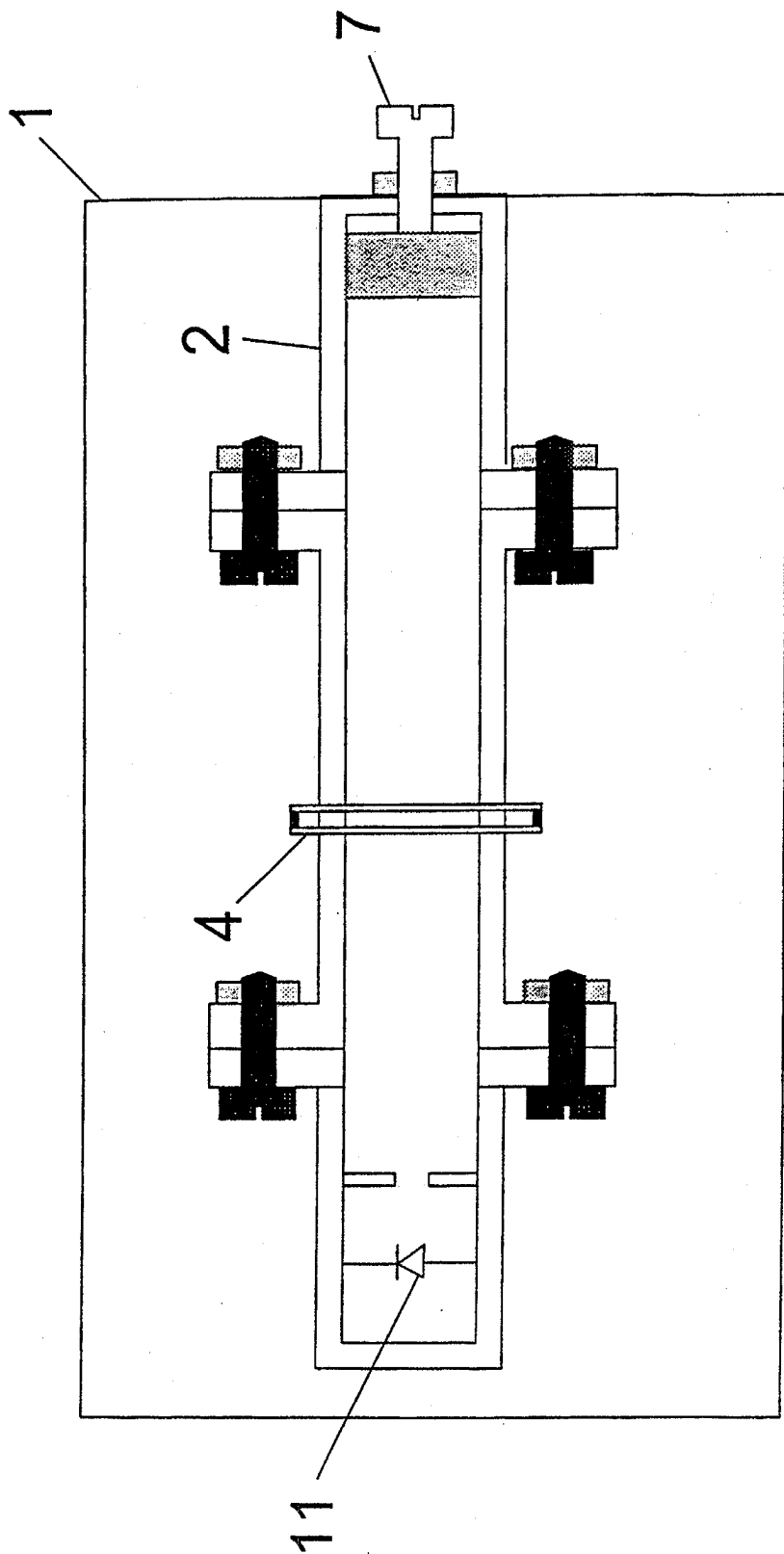
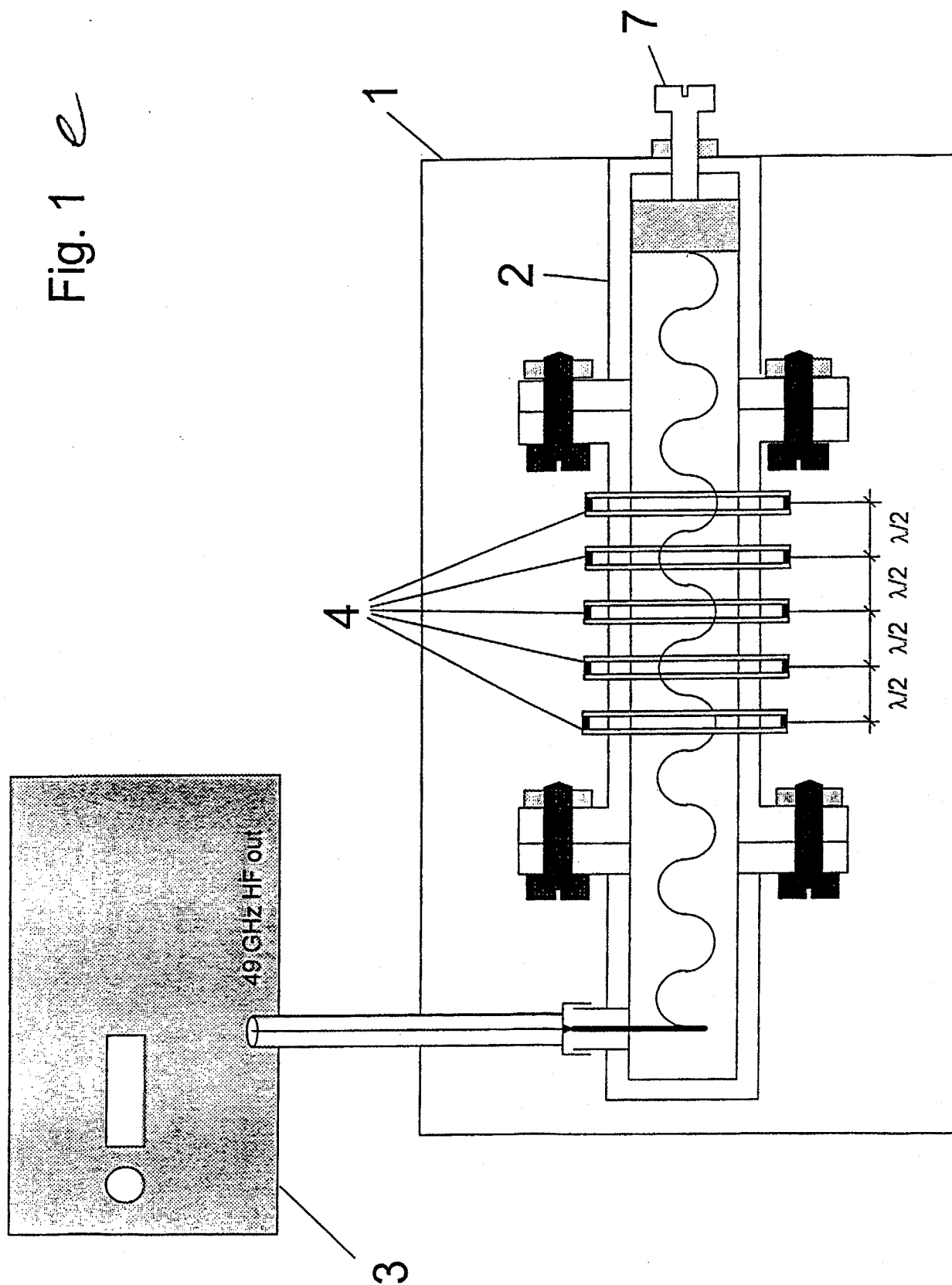
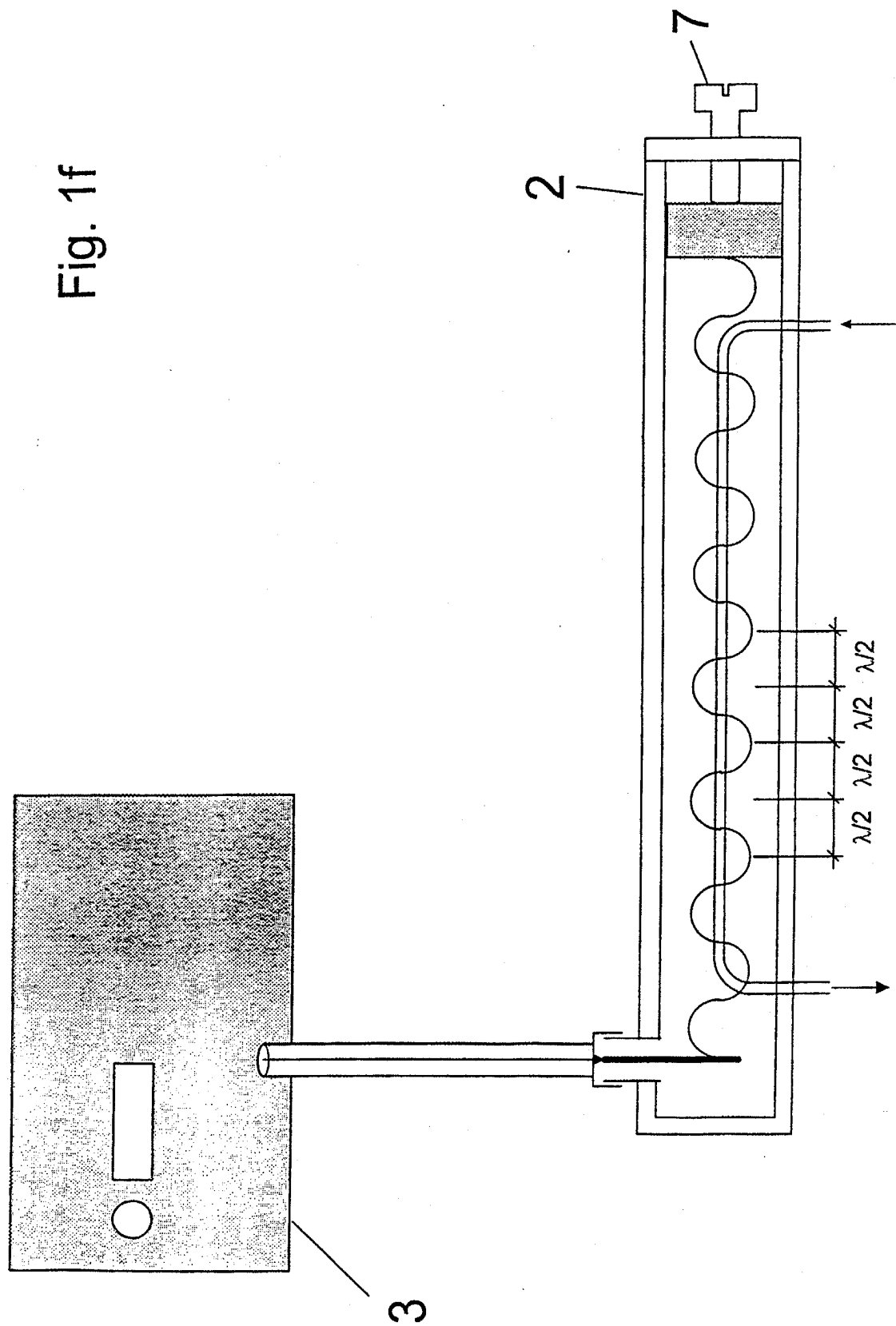


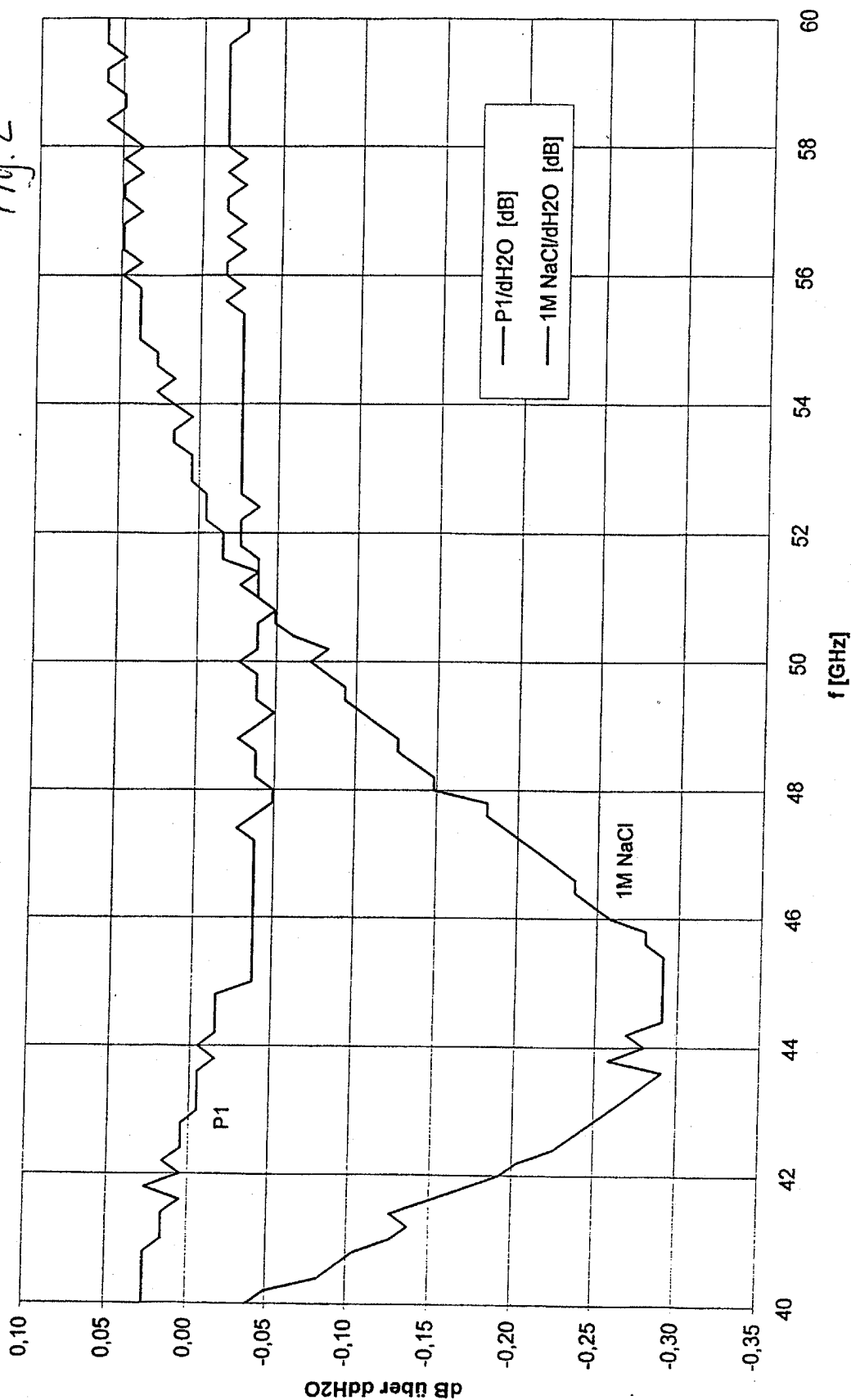
Fig. 1 e





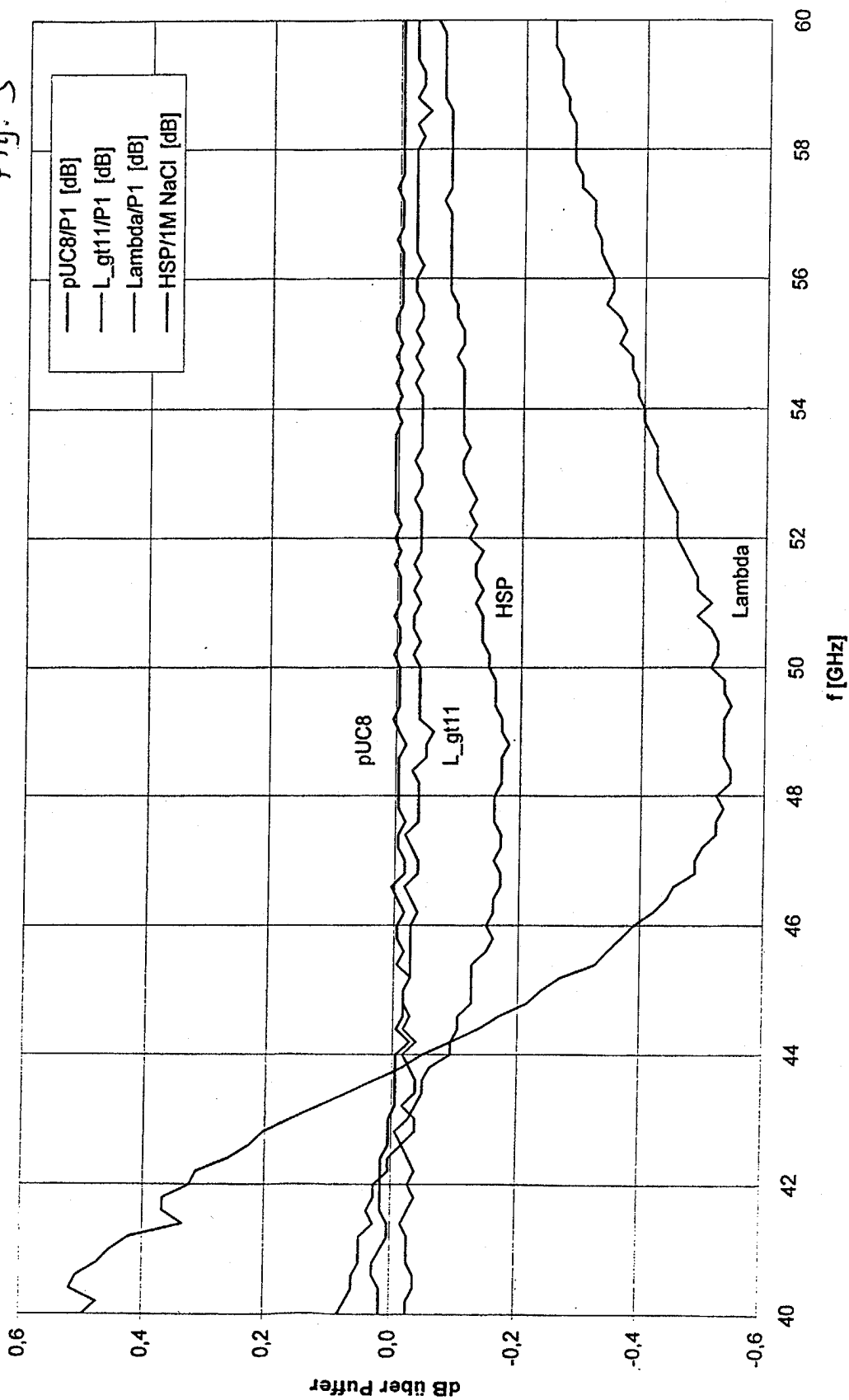
Lösungsmittel

Fig. 2



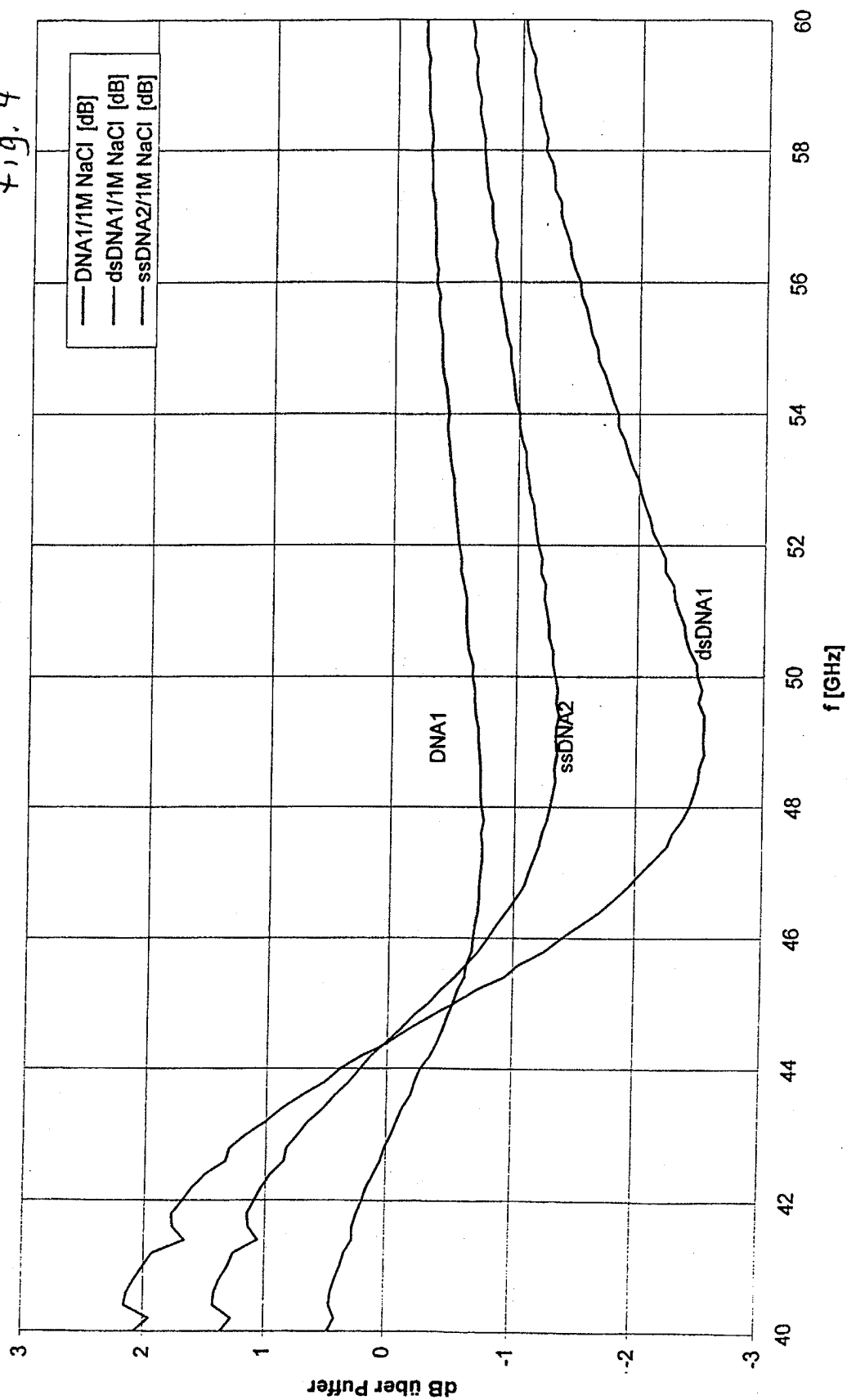
Hochmolekular DNA

Fig. 3



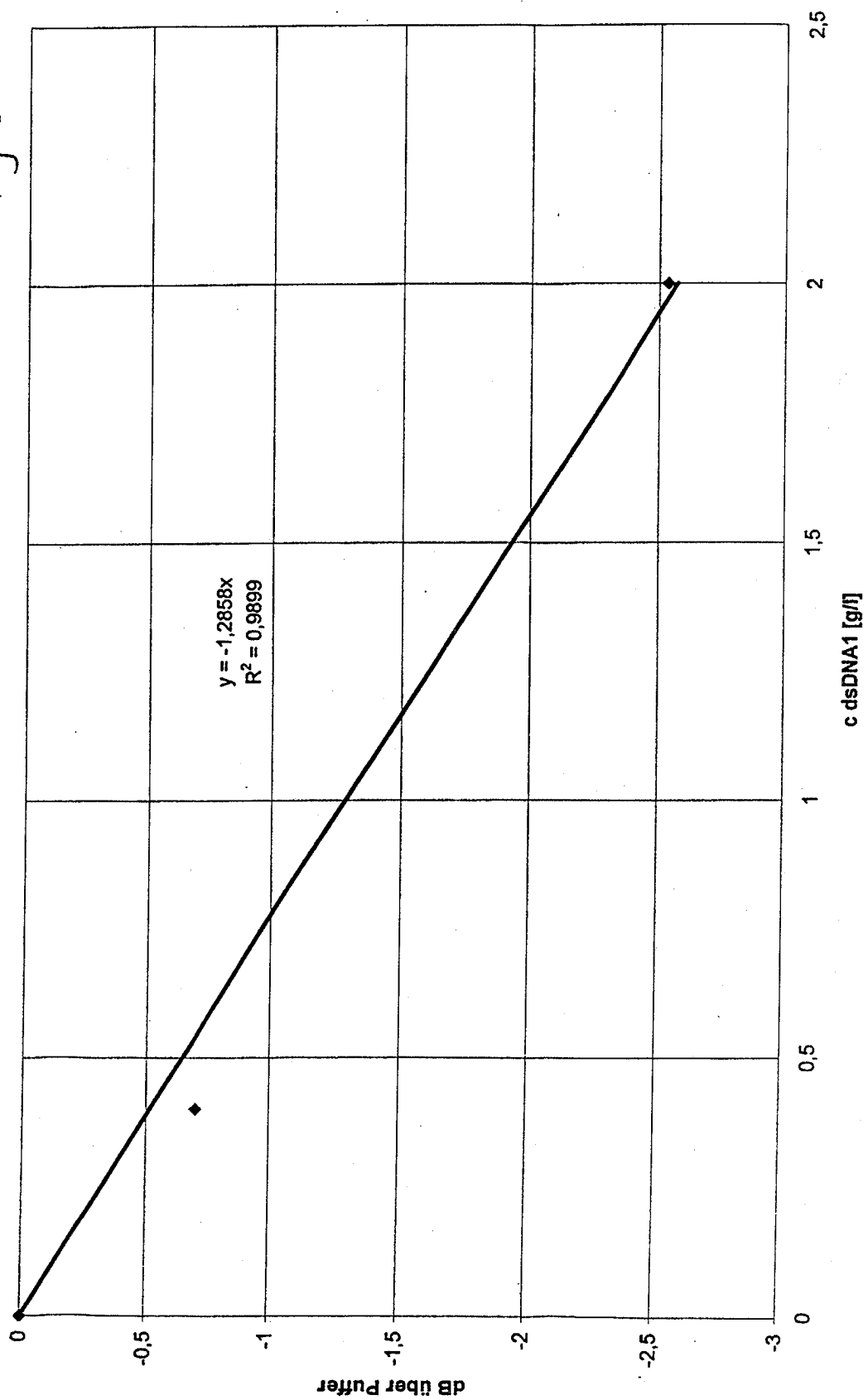
Oligos

Fig. 4



Konzentrationsabhängigkeit bei 49 GHz

Fig. 5



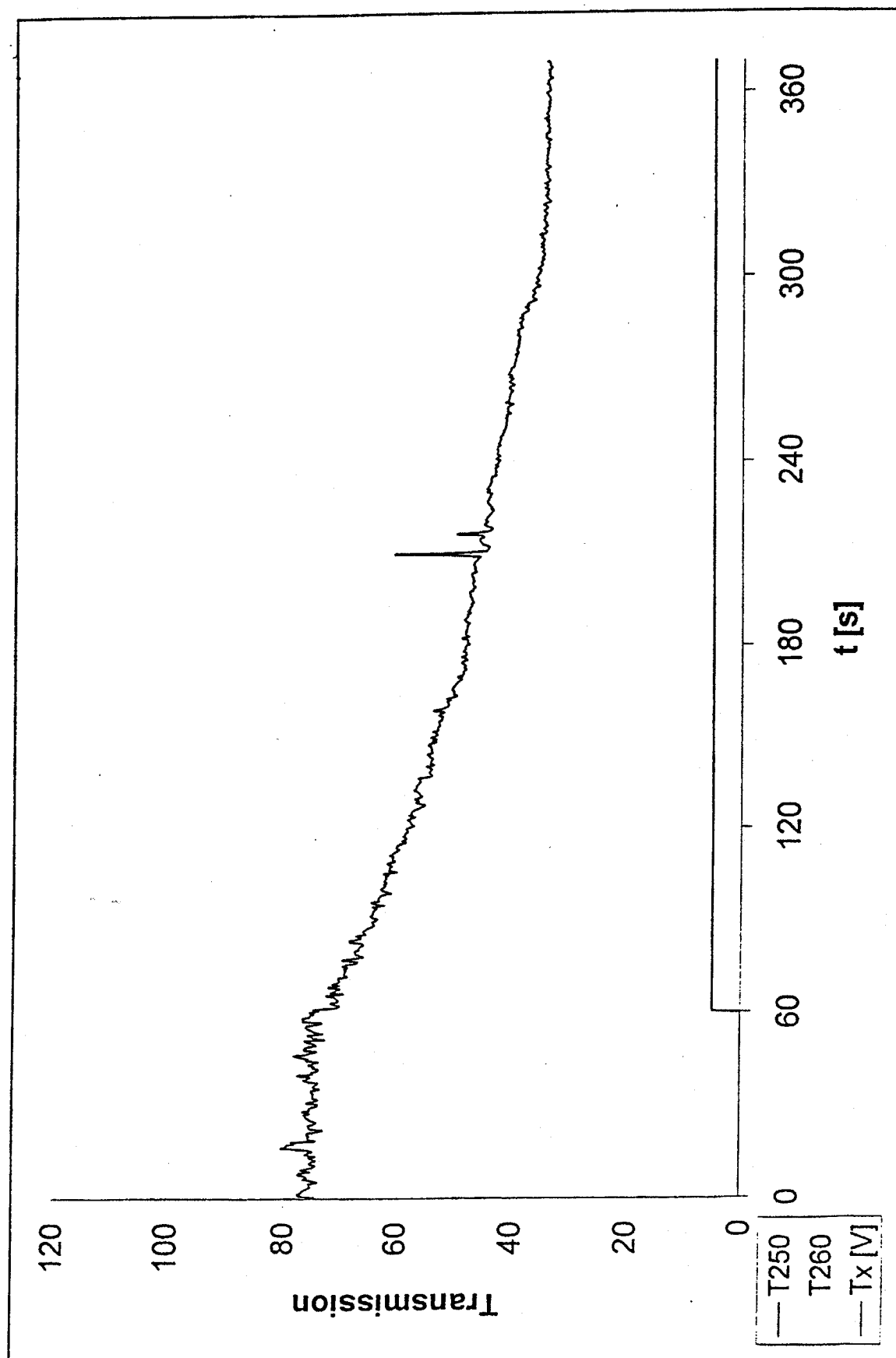


Fig. 6

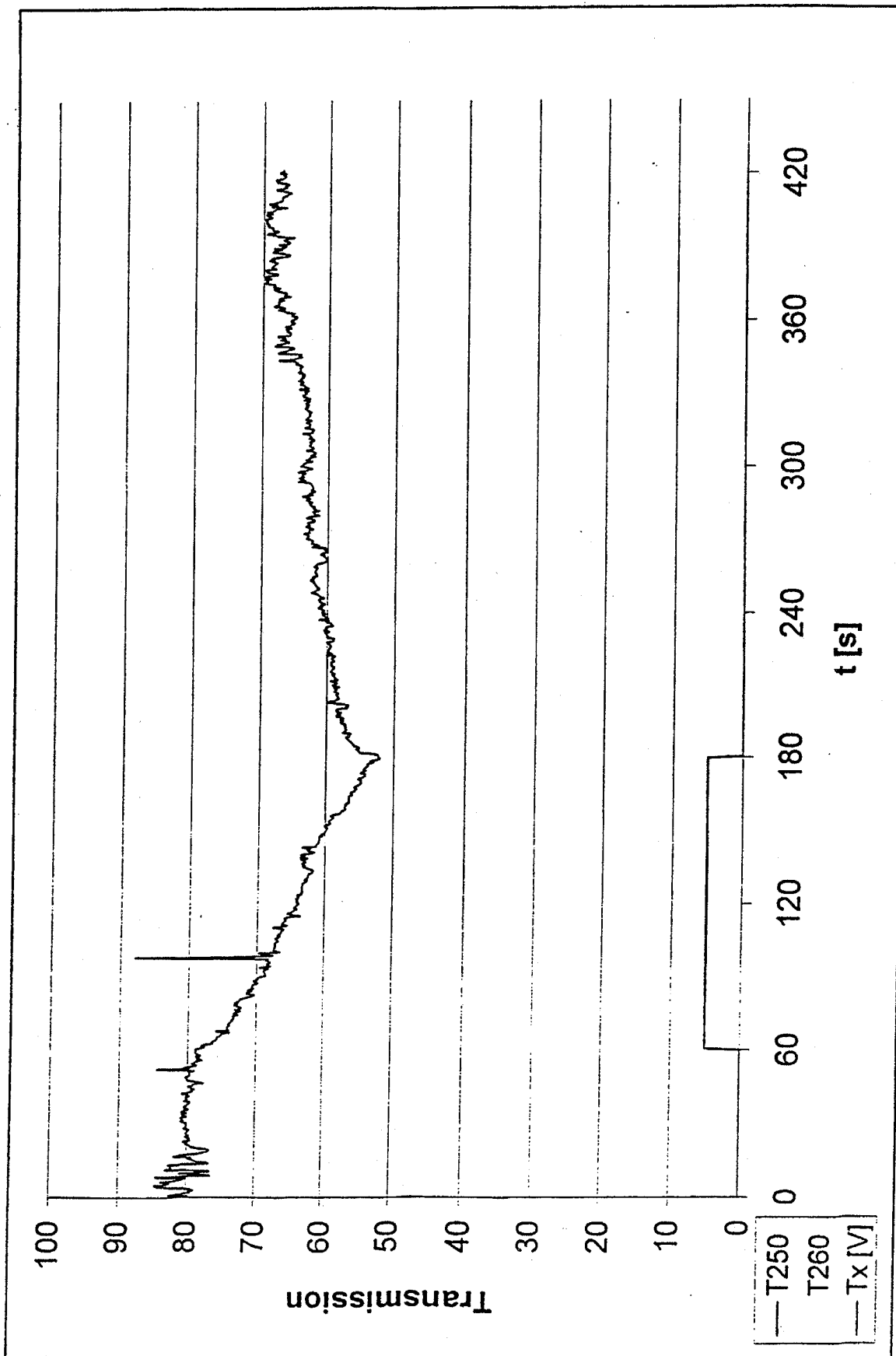


Fig. 7

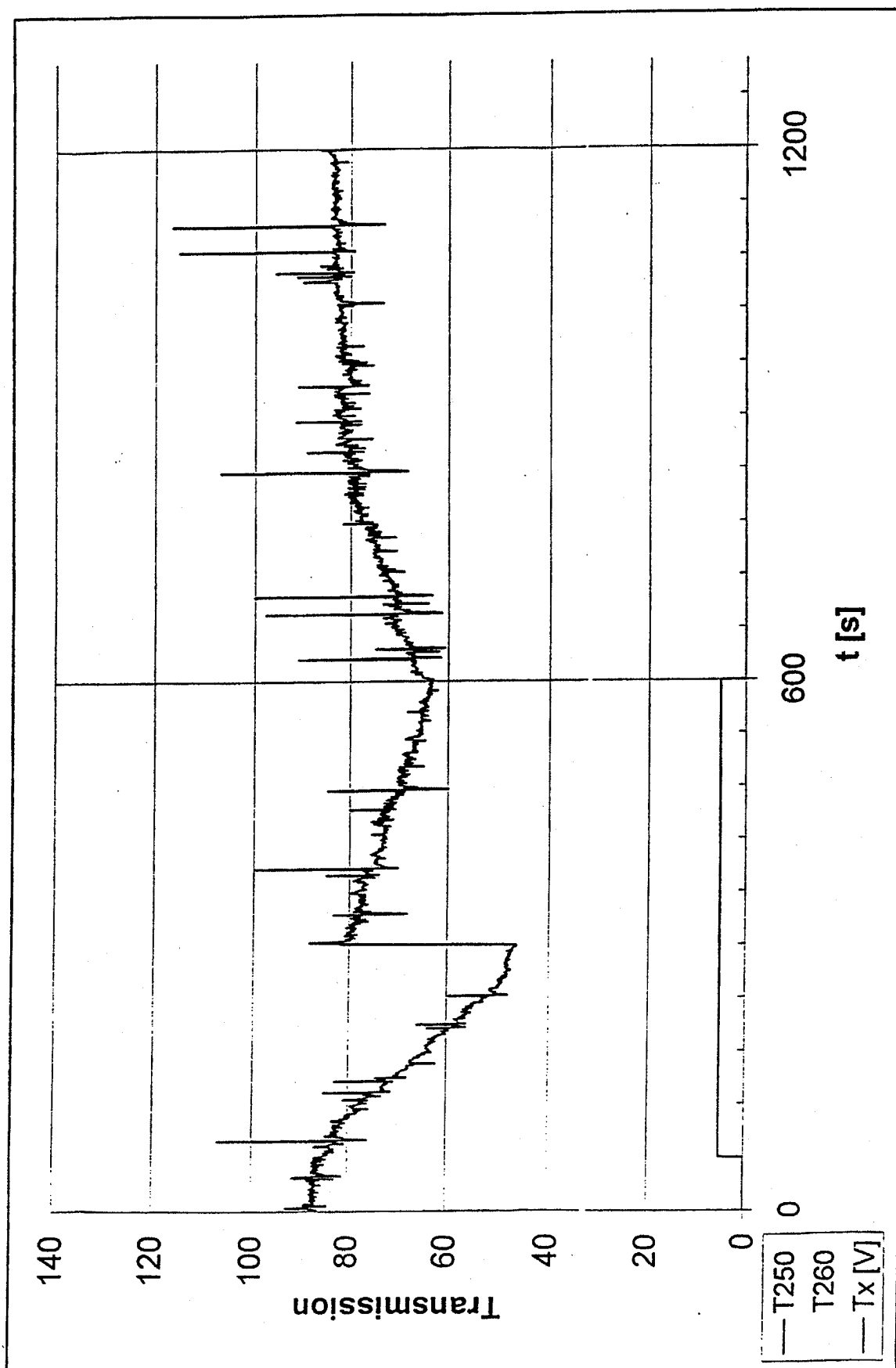


Fig. 8

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/10 C12Q1/68 B01L7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N C12Q B01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 29484 A (IMAGEN INC) 22 December 1994 (1994-12-22) see whole doc. esp. claims and p.10 ---	1-8
A	WO 98 06876 A (FRANCISKOVICH PHILLIP P ;PHARMACIA BIOTECH INC (US)) 19 February 1998 (1998-02-19) cited in the application the whole document ---	
A	FR 2 654 000 A (DEFITECH SA) 10 May 1991 (1991-05-10) see claims et p.6 ---	
P, X	WO 99 39008 A (STEVENS INST TECHNOLOGY ;SALEM HARRY (US); US GOVERNMENT (US); CUI) 5 August 1999 (1999-08-05) the whole document -----	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 July 2000

Date of mailing of the international search report

25/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Müller, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/00338

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9429484	A	22-12-1994	AT 165118 T	15-05-1998
			AU 690124 B	23-04-1998
			AU 7106794 A	03-01-1995
			CA 2164706 A	22-12-1994
			DE 69409646 D	20-05-1998
			DE 69409646 T	06-08-1998
			DK 702728 T	02-06-1998
			EP 0702728 A	27-03-1996
			ES 2114692 T	01-06-1998
			GR 3026678 T	31-07-1998
			JP 8511425 T	03-12-1996
			US 5545540 A	13-08-1996
WO 9806876	A	19-02-1998	AU 4066997 A	06-03-1998
			EP 0943011 A	22-09-1999
FR 2654000	A	10-05-1991	NONE	
WO 9939008	A	05-08-1999	AU 2572999 A	16-08-1999

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C12N15/10 C12Q1/68 B01L7/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12Q B01L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 94 29484 A (IMAGEN INC) 22. Dezember 1994 (1994-12-22) see whole doc. esp. claims and p.10 ----	1-8
A	WO 98 06876 A (FRANCISKOVICH PHILLIP P ; PHARMACIA BIOTECH INC (US)) 19. Februar 1998 (1998-02-19) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----	
A	FR 2 654 000 A (DEFITECH SA) 10. Mai 1991 (1991-05-10) see claims et p.6 ----	
P,X	WO 99 39008 A (STEVENS INST TECHNOLOGY ; SALEM HARRY (US); US GOVERNMENT (US); CUI) 5. August 1999 (1999-08-05) das ganze Dokument -----	1-8



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. Juli 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

25/07/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Müller, F

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00338

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9429484 A	22-12-1994	AT 165118 T	15-05-1998
		AU 690124 B	23-04-1998
		AU 7106794 A	03-01-1995
		CA 2164706 A	22-12-1994
		DE 69409646 D	20-05-1998
		DE 69409646 T	06-08-1998
		DK 702728 T	02-06-1998
		EP 0702728 A	27-03-1996
		ES 2114692 T	01-06-1998
		GR 3026678 T	31-07-1998
		JP 8511425 T	03-12-1996
		US 5545540 A	13-08-1996
WO 9806876 A	19-02-1998	AU 4066997 A	06-03-1998
		EP 0943011 A	22-09-1999
FR 2654000 A	10-05-1991	KEINE	
WO 9939008 A	05-08-1999	AU 2572999 A	16-08-1999